

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

2012年5月8日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590017

研究課題名（和文） Dアミノ酸を組み込んだ新しい概念に基づく持続性プロテアーゼ阻害剤の開発

研究課題名（英文） Development of a novel persistent protease inhibitor containing D-amino acid

研究代表者

赤路 健一（AKAJI KENICHI）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60142296

研究成果の概要（和文）：HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤についてすでに申請者が見出している遷移状態類似型阻害剤の立体配置を Retro Inverso 変換させた持続性阻害剤を創製した。これにより、阻害活性発現に必須となる中心骨格立体配置を注意深く選ぶことにより、残りのアミノ酸構造をすべて D 型に変換できることを明らかにした。また、SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤について、R188I 変異型 SARS 3CL プロテアーゼを利用した信頼性の高い汎用型阻害剤評価系を確立し、ペプチドアルデヒドが高い阻害活性を示すことを明らかにした。さらに、プロテアーゼ・阻害剤複合体の X 線構造解析による側鎖構造の最適化を行った結果、基質配列とは全く異なる低分子型阻害剤の創製に成功した。

研究成果の概要（英文）：Effects of Retro-Inverso (RI) modifications of HTLV-1 protease inhibitors containing a hydroxyethylamine isoster backbone were clarified. Four diastereomers with different configurations at the isoster hydroxyl site and the scissile site substituent were synthesized. Inhibitory activities of the new inhibitors suggest that partially modified RI inhibitors would interact with HTLV-1 protease in the same manner as the parent hydroxyethylamine inhibitor. The design and evaluation of low-molecular weight peptide-based SARS 3CL protease inhibitors are also clarified. Structural optimization was carried out based on X-ray crystallographic analyses of the R188I SARS 3CL protease in a complex with each inhibitor to provide a tetrapeptide aldehyde with an IC<sub>50</sub> value of 98 nM. The resulting compound carried no substrate sequence, except for a P<sub>3</sub> site directed toward the outside of the protease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：SARS、HTLV-1、プロテアーゼ阻害剤、構造解析、D アミノ酸、Retro-Inverso

## 1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (ATL) は欧米ではほとんど認められない疾患であるため、この原因ウイルス HTLV-1 由来蛋白質に関しては、世界中で数研究グループが研究に従事しているに過ぎない。申請者は数年前から HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤についての研究を進めてきた。まず、自己分解抵抗性変異型プロテアーゼの化学全合成を世界ではじめて成功させ、阻害活性評価系の構築に成功した (Teruya, et.al. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1487)。次いで遷移状態 mimic 構造を中心を持つ阻害剤の立体選択的合成による必須立体配置の特定 (Akaji et.al. *J.Org.Chem.* **2003**, 68, 475) と、付与すべき最小限のアミノ酸配列の特定 (Naka et.al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3761) に成功した。

一方、SARS コロナウイルス (SARS CoV) に関する研究は、当初の SARS 感染が発生した中国・台湾で主に続けられているが、SARS 治療薬およびワクチンはいまだ開発されていない。申請者は SARS ウイルスの増殖に必須となる 3CL プロテアーゼが 188 位 Arg の位置で分解を受けやすく、このことが天然型 3CL プロテアーゼの大量調製を困難にしている主要原因であることを世界ではじめて見出した。ついで、この Arg を Ile に変えた変異型 3CL プロテアーゼ (R188I 3CL プロテアーゼ) が天然型プロテアーゼの  $10^6$  倍もの高い活性を示すことを見出した (特願 2007-219804 ; Akaji, et.al. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 9400)。

## 2. 研究の目的

本研究では、プロテアーゼ阻害に基づくウイルス性感染症の治療薬開発を最終目標におき、D アミノ酸を組み込んだ Retro Inverso 変換に基づく持続性プロテアーゼ阻害剤の設計・合成と評価を行う。すなわち、阻害活性発現の中心となる骨格を立体反転させると同時に、基質配列に基づく特異的アミノ酸の立体配置を D 型に反転させその配列順序も逆転させる。生理活性ペプチドに Retro Inverso 変換 (アミノ酸配列の逆転と D アミノ酸への反転) を行っても、元のペプチドとほぼ同様の立体的な特徴を維持でき本来の生理活性を保持することが知られている (Chorev & Goodman, *Acc.Chem.Res.* **1993**, 26, 266)。この Retro Inverso 変換の特性を阻害剤中心構造の反転と組み合わせることにより、プロテアーゼ特異性を大きく損なうことなく遷

移状態 mimic 形成に必要な立体配置を保持できる。本研究では、この新しい手法に基づき、生体内分解にとらわれることなく中心構造とアミノ酸配列の設計・評価を行い、迅速な持続性阻害剤シーズの探索を進める。

## 3. 研究の方法

### (1) HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤について

一連の Retro Inverso 変換の基本スキームを確立する。申請者らが研究を進めてきた基質遷移状態 mimic 型阻害剤を Retro Inverso 型持続性阻害剤へ変換する。従来型阻害剤のアミノ酸配列を Retro Inverso 変換した阻害剤を合成した後、阻害中心構造である水酸基と隣接側鎖の位置と立体配置を最適化する。ついで、末端置換基の最適化を行う。具体的方法は以下のとおりである。

①持続性 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤設計の基本スキーム確立 ; これまでの研究で高い阻害能を示すことが確認されたヒドロキシエチルアミン型阻害剤を元に、そのアミノ酸配列のみを Retro Inverso 変換した化合物を合成した。中心骨格のアミノ基側とカルボキシル基側の両方への選択的ペプチド鎖伸長を可能とするため、水酸基を樹脂への担持に利用する新たな固相合成経路を確立し、D アミノ酸を順次縮合した。中心構造の水酸基と隣接側鎖の立体配置を最適化するため、可能な 4 種の立体異性体を立体選択的に合成した。まず、プロリンから 1 炭素増炭したアルデヒド誘導体を新たに合成し、インダノール不斉補助基を利用した立体選択的アルドール反応を行った。ついで、それぞれの鍵中間体を出発原料として Retro Inverso 型化合物を合成し、それらの HTLV-1 プロテアーゼ阻害能を評価した。

②持続性 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤の最適化 ; 得られた最適配置を持った Retro Inverso 型阻害剤について、構造活性相関研究を行った。まず最適配置のみを選択的に構築できる立体選択的合成法を確立し、固相合成経路を確立した。この際、構造変換が容易な N 末側に構造多様性を導入した。得られた化合物について前年度で確立した方法による速やかな活性評価を行い、構造最適化を進めた。

### (2) SARS 3CL プロテアーゼについて

まず、高活性 R188I 変異型 3CL プロテアーゼを用いた評価系で、阻害中心構造として最適の官能基を探索する。ついで、構造最適化を行う。あわせて、変異型プロテアーゼとの複合体結晶化条件の探索を進め、X 線構造解

析による原子レベルでの最適化を行う。具体的方法は以下のとおりである。

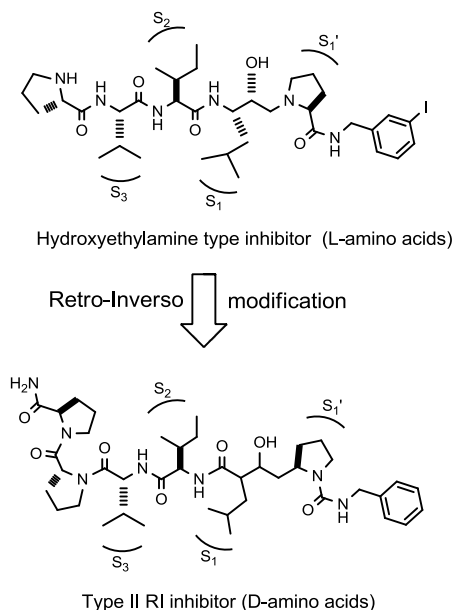
①持続性阻害剤への変換に適した高活性 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の探索；まず、R188I 変異型 SARS 3CL プロテアーゼを用いる自動化 HPLC による阻害剤 IC<sub>50</sub> 値の比較システムを構築した。ついで、プロテアーゼ活性中心のチオール基と相互作用しうる各種官能基を持った阻害剤を合成し、最適官能基を選択した。アルコールを有する誘導体をエステルの NaBH<sub>4</sub>還元により合成、アルデヒド体誘導体は Weinreb amide の還元、不飽和誘導体は Horner Emmons 反応、ボラン酸誘導体は立体選択的のヒドロボレーション反応により合成した。それぞれの誘導体のプロテアーゼ阻害活性を上記の自動化システムで評価し、高活性化合物を選定した。

これらの合成・評価と平行して、プロテアーゼ・阻害剤複合体の構造解析に向けた結晶化条件を検討した。R188I 変異型 SARS 3CL プロテアーゼ単体を用いて、構造解析に適した単結晶作成条件を探索したのち、阻害剤との複合体構造解析に用いる大型単結晶析出条件を確定させた。

②各種化合物の比較・検討の結果、高い阻害活性が得られたアルデヒドペプチド誘導体について、上記で確立した結晶化条件をもとに、阻害剤と R188I SARS 3CL プロテアーゼとの共結晶作成を順次行った。複合体の X 線構造解析で得られた立体構造をもとに、原子レベルでの構造最適化を進め高活性かつ低分子型阻害剤探索を行った。

#### 4. 研究成果

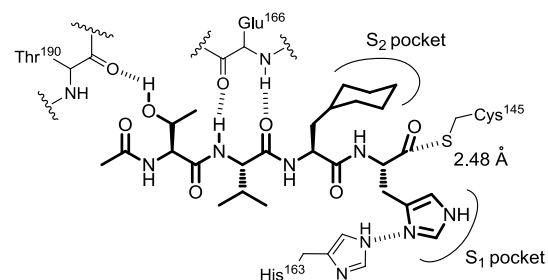
(1) HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤についてすでに申請者が見出している遷移状態類似型阻害剤の立体配置を反転させた持続性阻害剤を創製した。



まず、通常の Retro Inverso 変換を行った化合物について検討した結果、遷移状態立体構造を通常の Retro Inverso 変換した化合物には阻害活性が見られないが、阻害活性発現の中心となる水酸基と隣接側鎖の位置にみを逆転させた化合物は十分な阻害活性を示すことを見出した。さらに、この中心水酸基と隣接側鎖の相対配置は、返還前の最適立体配置に対応するものであることも確認された。これにより、阻害活性発現に必須となる中心骨格立体配置を注意深く選ぶことにより、残りのアミノ酸構造をすべて D 型に変換できることを明らかにした。これらの結果は HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤のみならず、基質遷移状態型阻害剤一般に広く適用可能な方法論である。さらに、側鎖に不整構造を有するアミノ酸の構造最適化による構造活性相関についても新たな知見を得ることができ、詳細な検討を進めている。

#### (2) SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の設計・合成と評価について

R188I 変異型 SARS 3CL プロテアーゼを利用した信頼性の高い汎用型阻害剤評価系を確立した。本評価系を用い、SARS プロテアーゼの基質配列と遷移状態 mimic となりうるさまざまな官能基（アルデヒド・アルコール・不飽和カルボニル・エポキシド・ボラン酸など）を持つ阻害剤を合成・評価し、ペプチドアルデヒドが高い阻害活性を示すことを明らかにした。ついで、R188I 変異型 SARS 3CL プロテアーゼ・阻害剤複合体の結晶化条件を確立し、X 線構造解析による原子レベルでの相互作用解析を行った。これらの結果をもとに、各サブサイトでの相互作用様式を明らかにすることに成功し、側鎖構造の最適化を行った結果基質配列とは全く異なる低分子型阻害剤の創製に成功した。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Akaji, K.; Konno, H.; Mitsui, H.; Teruya, K.; Shimamoto, Y.; Hattori, Y.; Ozaki, T.; Kusunoki, M.; Sanjoh, A. Structure-based

Design, Synthesis, and Evaluation of Peptide-mimetic SARS 3CL Protease Inhibitors, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7962-7937. (査読有)

- ② Konno, H.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthesis of Tokaramide A, a Cysteine Protease Inhibitor from Marine Sponge *Theonella* aff. *Mirabilis*. *Tetrahedron* **2011**, 67, 9067-9071.
- ③ Konno, H.; Makabe, H.; Hattori, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthesis of solamin type mono-THF acetogenins using cross-methathesis, *Tetrahedron* **2010**, 66, 7946-7953. (査読有)
- ④ Konno, K.; Takebayashi, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. Synthetic studies on callipeltins: Stereoselective syntheses of (3S,4R)-3,4-Dimethyl-L-pyroglutamic acid and Fmoc-D-allothreonine from serine derivatives, *Heterocycles* **2010**, 81, 79-89. (査読有)
- ⑤ Tatsumi, T.; Awahara, C.; Naka, H.; Aimoto, S.; Konno, K.; Nosaka, K.; Akaji, K. Evaluation of retero-inverso modification of HTLV-1 protease inhibitors containing a hydroxylethyl amine isoster, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2720-2727. (査読有)
- ⑥ Konno H.; Aimoto S.; Smith SO.; Nosaka K.; Akaji K.; Synthesis of [19, 35, 36-13C3]-labeled TAK779 as a Molecular Probe. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5769-5774. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Hiroyuki Konno, Manabu Ishii, Yasunao Hattori, Kazuto Nosaka, Kenichi Akaji Synthesis and Evaluation of Small Peptide Inhibitors for SARS 3CL Protease, 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, December, 2010.
- ② 今野博行、石井学、野坂和人、服部恭尚、赤路健一 構造解析に基づく SARS 3CL Protease 阻害剤の設計とその阻害能評価、東北支部第 145 回大会、2010 年 9 月、仙台
- ③ 今野博行、石井学、服部恭尚、野坂和人、赤路健一 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤創成を目指したペプチドアルデヒドの合成と阻害能評価、日本農芸化学会大会、2010 年 3 月、東京
- ④ 今野博行、野坂和人、小野塚真理、三井寛典、赤路健一、楠木正巳、尾崎健、三城明 構造解析に基づくペプチドアルデヒド型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と評価、第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム、2009 年 11 月 16 日、金沢。

⑤ Akaji K., Nosaka K., Hattori Y., Mitsui H., Konno H., Kusunoki M., Ozaki T., Sanjo A. Design of small molecular inhibitor for SARS 3CL protease based on structure analysis. 第 46 回ペプチド討論会、2009 年 11 月 4 日、北九州。

⑥ 今野博行、石井学、服部恭尚、野坂和人、赤路健一 固相法によるペプチドアルデヒド類の実践的合成法の検討。第 46 回ペプチド討論会、2009 年 11 月 4 日、北九州。

⑦ 三井寛法、高橋麻矢子、今野博行、野坂和人、赤路健一 SARS 3CL プロテアーゼ阻害に必要なチオール反応性官能基の評価。日本薬学会第 129 年会、京都、2009.3.27.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/lab/yakuhi/n/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤路健一 (AKAJI KENICHI)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：60142296

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

野坂和人 (NOSAKA KAZUTO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10228314

今野博行 (KONNO HIROYUKI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：50325247